대한내과학회지 : 제 58 권 제 3 호 2000

# 가족성 고콜레스테롤혈증 유전자 진단에서 저밀도지단백 수용체 유전자 및 인접 유전 표식자의 유용성

연세대학교 의과대학 내과학교실 심장내과*, 심혈관연구소 †, 임상병리학 교실 ‡
조선대학교 의과대학 내과학교실 §

최병주*· 박현영†· 김정호‡· 김건영§· 남상민‡· 정남식*,†· 조승연*,†· 장양수*,†

=Abstract=

## The usefulness of the genetic markers at the low-density lipoprotein receptor gene locus for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia

Byoung Joo Choi, M.D.*, Hyun-Young Park, M.D.†, Jeong-Ho Kim, M.D.‡
Geon Young Kim, M.D.§ Sang Min Nam, M.S.‡, Namsik Chung, M.D.*,†
Seung-Yun Cho, M.D.*,† and Yangsoo Jang, M.D.*,†

*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine**,
*Yonsei Cardiovascular Research Institute †,*
*Department of Clinical Pathology ‡ College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea*
*Department of Internal Medicine § Chosun University, Kwangju, Korea*

**Background :** Familial hypercholesterolemia(FH) is an autosomal dominant metabolic disorder caused by the mutation in low density lipoprotein receptor(LDLR) gene. However, direct genetic diagnosis of LDLR gene mutation is not easily available because more than 300 mutations have been described in LDLR gene of FH patients. Therefore indirect genetic diagnosis using the genetic markers can be used to follow the inheritance of defective gene in FH families. The purpose of this study was to evaluate the usefulness of indirect genetic markers for detecting identical-by-descent LDLR gene abnormalities in FH families.

**Methods** : We examined the allele frequency, heterozygosity, polymorphism information content(PIC) of each genetic markers(D19S394, *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II, ATn, D19S221) in 94 unrelated healthy subjects. The genetic polymorphic haplotypes in 3 FH families were also determined.

**Results** : The heterozygosity and PIC values of RFLP's(*Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II) were 0.51/0.344, 0.25/0.223, 0.28/0.233 and microsatellite markers(D19S394, ATn, D19S221) were 0.64/0.558, 0.56/0.455, 0.60/0.475. *Hinc* II and *Ava* II were significantly linked($|D|=0.72$, $p<0.05$). The cumulative PIC values of *Taq* I+*Hinc* II, *Taq* I+*Hinc* II+ATn, D19S394+ATn were 0.520, 0.814, 0.813, respectively.

When applied in the FH pedigree, the genetic diagnosis using only one marker was not available in most cases. However, combination of two or more genetic markers could successfully discriminate

• 접 수 : 1999년 8월 11일
• 통 과 : 1999년 11월 10일
• 교신저자 : 장양수, 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세의료원 심장혈관센터 심장내과(120-752)
E-mail : jangys1212@yumc.yonsei.ac.kr
본 연구는 1998년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 지원에 의해 이루어졌음.

the affected and unaffected members in FH families. Among the several combinations of the genetic markers, the combination of D19S394 and ATn was supposed to be the most effective and informative. Because one case of recombination was suspected in D19S221 allele, it was thought to be carefully used for genetic diagnosis of FH.

**Conclusion** : We concluded that indirect genetic diagnosis using intragenic or extragenic genetic markers was useful for detecting identical-by-descent LDLR gene abnormalities in FH families and the most effective and informative combination of genetic marker seemed to be D19S394 and ATn. (Korean J Med 58:283-292, 2000)

**Key Words** : Familial hypercholesterolemia, Genetic marker

## 서 론

가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolemia, 이하 FH)은 상염색체 우성 유전 질환으로 대개의 환자들에서 저밀도 지단백수용체(low-density lipoprotein receptor, 이하 LDLR) 유전자의 돌연변이에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다[1-3]. FH의 발생빈도는 500-1000명당 1명 정도로 알려져 있으며 정상인에 비해 약 2-4배 증가된 LDL콜레스테롤 농도를 보여 20-30대의 비교적 이른 시기에 관상동맥경화증을 나타낸다.

현재 FH의 진단은 임상 양상에 의존하고 있는데, 증가된 LDL콜레스테롤, 정상 중성지방(triglyceride) 농도를 보이는 제 2a형 고지단백혈증(hyperlipoproteinemia)이 있으면서 tendon xanthoma, 가족력상 유사한 양상을 보이는 사람이 있는 경우에 FH를 의심하여 진단 할 수 있다. 그러나, 2a형 고지단백혈증을 보이는 경우는 FH 외에도 다유전인자성 고콜레스테롤혈증(polygenic hypercholesterolemia)등이 있으며 갑상선 기능저하증, 신증후군 등의 기타 대사 장애도 있어 감별을 요한다. 한편 FH 환자의 약 75%에서만이 tendon xanthoma를 나타내며, 10%정도에서는 중성지방이 증가된 경우가 있는 것으로 알려져 있기 때문에 FH를 임상 양상에만 의존하여 진단하는 것에는 한계가 있다. 따라서 FH의 확진을 위해서는 LDLR 유전자 돌연변이에 대한 직접적 또는 간접적 유전자 진단이 필요하다.

LDLR의 유전자는 19번 염색체의 short arm에 위치하며 18개의 exon으로 구성되는데, 1984년 Yamamoto 등에 의하여 cloning된 후 LDLR 유전자의 다양한 돌연변이가 FH를 일으킨다는 것이 알려져 있으며[4-6], 현재까지 300여 가지 이상의 다양한 LDLR 유전자 돌연변이가 보고된 바 있다( Database of LDLR gene mutations in FH: http//www.ucl.ac.uk/fh). 국내에서는 이러한 LDLR 유전자 돌연변이에 대한 보고가 많지는 않으나 김등[7]이 25명의 FH 환자에서 18가지 LDLR 유전자 돌연변이를 보고하여 한국인에서도 역시 LDLR 유전자 돌연변이가 다양함을 시사하고 있다.

이와 같이 다양한 유전자 돌연변이로 인해 유전질환이 발생하는 경우 각 가계에 대하여 직접적 유전자 변이를 검색하는 것은 많은 시간과 노력이 필요하며, 검사에 대한 비용도 상당하여 실제 임상적인 유전자 진단에 이용하기에는 어려움이 있다.

유전 표식자(genetic marker)를 이용한 간접적 유전자 진단은 다른 유전적 질환에서 이미 이용되고 있는 방법으로, 직접적인 유전자 변이를 찾지 않더라도 환자와 부모의 이상 유전자 공유(identical-by-descent)여부에 의존하여 유전자 이상을 가지고 있는지 알아내는 방법이다. 따라서 FH와 같이 다양한 유전자 변이로 유전적 이상을 직접적으로 검사하는 것이 어렵고 가족성 성향이 있는 경우 유전 표식자에 의한 유전학적 진단이 유용하게 이용될 수 있다.

유전 표식자로는 제한효소절편길이 다형성(restriction fragment length polymorphism, 이하 RFLP)이 많이 이용되어 왔는데 RFLP 의 경우 검사 방법이 간편하나 heterozygosity, polymorphism information content (PIC)등이 낮아 유전 표식자로 이용하기 위해서는 여러 유전 표식자를 이용한 RFLP가 조합되어야 한다고 알려져 있다[8,9]. 반면 tandem repeat sequence와 같은 microsatellite marker의 경우는 한 두가지 표식자 만으로도 FH의 진단에 유용하게 이용될 수 있다고 보고된 바 있다[10,11].

현재 LDLR 유전자에는 *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II RFLP 및 exon18 3' 말단에 위치하는 (AT)n tandem repeat

**Table 1. Primer sequences for PCR of microsatellite markers**

| Marker | Oligonucleotide sequence | Tandem repeat |
|---|---|---|
| D19S394 | 5'-CCA AGA TCC TCT CCT GAG GT-3' | GATA |
| | 5'-CTT TCT ACC TTT CTA TCA TCT GTC A-3' | |
| ATn | 5'-CAC TTT GTA TAT TGG TTG AAA CTG T-3' | AT |
| | 5'-CAC TGA ACA AAT ACA GCA ACC AGG G-3' | |
| D19S221 | 5'-GCA AGA CTC TGA CTC AAC AAA A-3' | CA |
| | 5'-CAT AGA GAT CAA TGG CAT GAA A-3' | |

**Table 2. Primer sequences for PCR and the fragment sizes of RFLP markers**

| Marker | Oligonucleotide sequence | Fragment size |
|---|---|---|
| *Taq* I (intron1) | 5'-ATC TGA CGA GGA AAA CTG-3' | 600 and 450 bp |
| | 5'-GGC CAC AGC TGG AAA ACA-3' | |
| *Hinc* II (exon12) | 5'-TCT GGG ACT GGC ATC AGC AC-3' | 133, 99, 57 and 53 bp |
| | 5'-AGA TAG GCC GGT GGA TTC AC-3' | |
| *Ava* II (exon13) | 5'-NNN TTG CTG CCT GTT TAG-3' | 128 and 75 bp |
| | 5'-GTT CCT CCA AAG TTC CAA CC-3' | |

N: A, C, G or T. The nucleotides were randomly applied because the 5' end of the sense primer was not informative.

(ATn) 등의 LDLR 유전자내(intragenic) 유전 표식자와 D19S394 (GATA tetranucleotide repeat), D19S221 (CA dinucleotide repeat)와 같은 유전자외(extragenic) 유전 표식자가 알려져 있으며 이의 효율성에 대한 보고가 있으나, 국내에는 이들 유전 표식자에 대한 연구가 없는 상태이다[12,13]. 본 연구에서는 한국인에서 각 유전 표식자의 유용성을 평가함과 동시에 FH의 간접적인 유전자 진단에 가장 효율적인 유전 표식자의 조합을 찾아내고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

유전 표식자의 유용성을 평가하기 위하여 정상 혈중 지질농도를 보이며 혈연관계가 없는 정상 대조군 94명을 대상으로 각 유전 표식자의 allele 빈도, heterozygosity, PIC를 구하였으며 이를 바탕으로 FH 세 가족 15명을 대상으로 각 유전 표식자의 유용성을 검증하였다.

정상 대조군은 과거력상 허혈성 심질환이나, 중풍, 당뇨등 고지혈증 또는 고지혈증과 연관된 질환의 병력이 없고 현재 정상 혈중 지질 농도를 보이며 지질 강하 약제(lipid lowering agent)의 복용 과거력이 없는 사람으로 선정하였다.

FH 환자의 진단은 Weiss등이 기술했던 기준에 따랐다[12]. 고콜레스테롤혈증의 가족력이 있는 환자(proband) 및 가족 구성원을 대상으로 혈중 지질검사 및 이학적 검사를 시행하여 이들 중 LDL-콜레스테롤 160 mg/dl 이상, 정상 중성지방 농도, tendon xanthoma를 보이거나 본인 또는 자녀(first degree relative)가 60세 이전에 허혈성 심질환으로 진단된 병력이 있는 경우에 FH에 이환된 것으로 진단하였다.

### 2. DNA의 추출

정상 대조군 및 FH 환자 가족 구성원으로부터 혈액을 7 ml 채취하여 EDTA가 첨가된 시험관에 보관하였고, genomic DNA는 Wizard DNA purification system® (Promega Co., Madison, Wisconsin, U.S.A.)을 사용하여 말초 백혈구로부터 추출하였다.

### 3. Polymerase chain reaction(PCR) 방법 및 PCR 산물의 분석

FH 환자의 간접적 유전자 진단에서 유용성을 평가할 유전 표식자로서 D19S394, *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II, ATn, D19S221을 사용하였다. D19S394는 LDLR 유전자 5' 말단으로부터 250 kb telomere쪽에 위치하며 *Taq* I, *Hinc*

**Table 3. PCR conditions used to amplify the sequences of genetic markers**

| Marker | PCR condition | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Annealing | | Extension | | MgCl2 |
| D19S394 | 55℃ | 1min | 72℃ | 1min | 1.5mM |
| *Taq* I | 60℃ | 30sec | 68℃ | 2min | 1.0mM |
| *Hinc* II | 65℃ | 1min | 72℃ | 1min | 1.5mM |
| *Ava* II | 65℃ | 1min | 72℃ | 1min | 1.5mM |
| ATn | 55℃ | 1min | 72℃ | 1min | 1.5mM |
| D19S221 | 63℃ | 1min | 72℃ | 1min | 1.5mM |

II, *Ava* II는 RFLP 표식자로서 각각 intron 1, exon 12, exon 13에 존재한다. ATn은 exon 18의 3' 말단에 위치하며 D19S221은 LDLR 유전자의 3' 말단으로부터 1.3 Mb centromere쪽에 위치한다.

추출된 genomic DNA를 주형(template)으로 하여 각 유전 표식자 (RFLP 및 microsatellite marker)에 해당하는 부위의 primer를 설계하여 PCR을 시행하였다(Table 1, Table 2).

PCR은 20 μl반응으로 주형 DNA 50 ng, sense와 antisense primer 각각 10 pmole , 62.5 μM of dNTPs, 45 mM Tris-HCl (pH 8.8), 11 mM ammonium sulfate, 6.7 mM β-mercaptoethanol, 4.5 μM EDTA, 각 PCR 조건에 맞는 적량의 MgCl2(Table 3), 그리고 0.4 U *Taq* polymerase(AmpliTaq Gold®, Roche Molecular System Inc., Branchburg, New Jersey, U.S.A.)와 혼합하여 시행하였다. 먼저 95°C에서 10분간 *Taq* polymerase를 활성화시킨 뒤 94°C에서 1분간 DNA를 변성(denaturation)시키고 각 PCR 조건에 맞게 annealing과 extension을 총 35주기 반복한 뒤 72°C에서 5분간 final extension을 시행하였다.

유전 표식자가 microsatellite marker인 경우는 sense primer를 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 [γ-32P]ATP와 반응시켜 end labelling후 PCR을 시행하였으며, PCR 산물을 94°C에서 5분간 변성후 denaturing 6% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 phosphor-imaging plate reader(Bio-imaging analyser system 2500®, Fuji Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 PCR 산물의 분자량에 따른 전기 영동상의

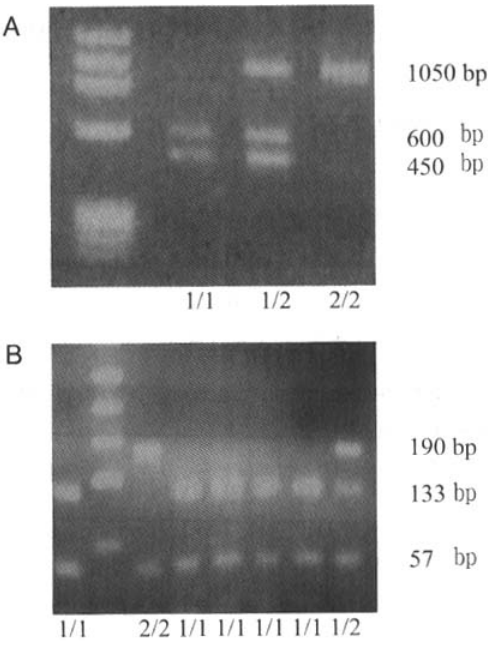
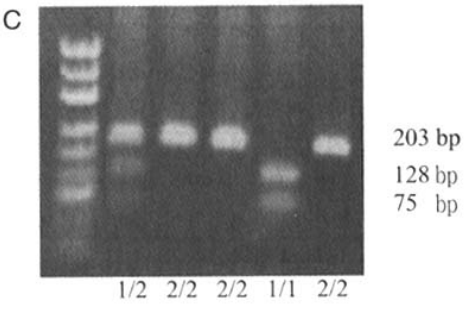



**Figure 1.** Genotypes of RFLP's. "1" indicates presence and "2" indicates absence of the respective restriction site. A: *Taq* I, B: *Hinc* II, C: *Ava* II.



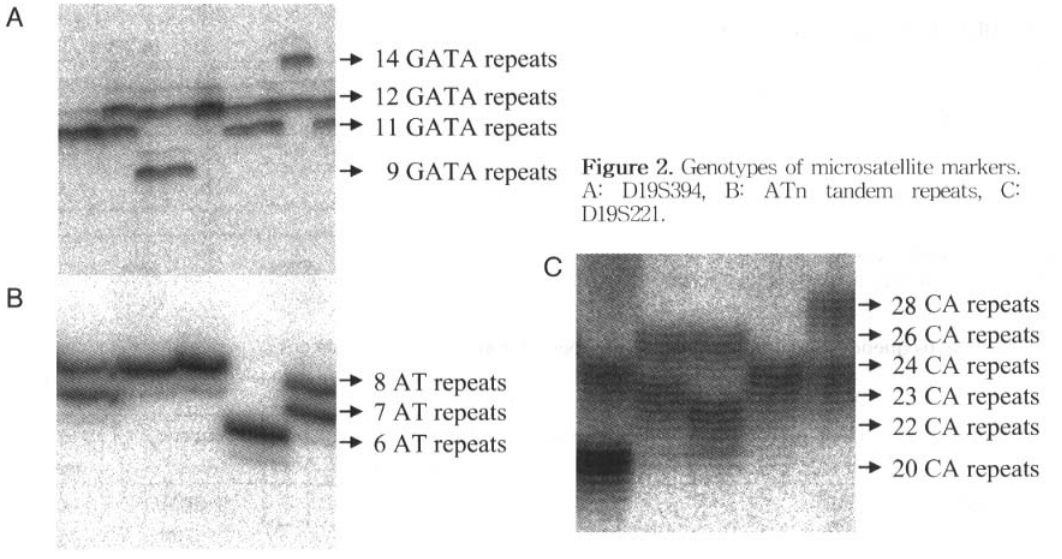



**Figure 2.** Genotypes of microsatellite markers. A: D19S394, B: ATn tandem repeats, C: D19S221.

이동 속도에 따라 유전형을 결정하였으며 염기서열 분석을 통해 각 microsatellite marker의 tandem repeat number를 구하였다(Figure 2). 유전 표식자가 RFLP인 경우는 PCR 산물을 각 제한 효소로 처리 후 *Taq* I은 65℃에서 *Hinc* II와 *Ava* II는 37℃에서 6시간 이상 반응 후 1.5% agarose gel(단, *Hinc* II인 경우는 3% MetaPhor® agarose gel(FMC BioProducts Co., Rockland, Maine, U.S.A.))에서 전기영동 하였으며 ethidium bromide로 발색한 뒤 UV lamp하에 관찰하였다. 제한효소에 의한 유전형은 제한효소에 의한 절단 여부에 따라 결정하였다(Figure 1).

### 4. 유전 표식자의 유용성 분석

유전 표식자의 유용성은 heterozygosity 및 PIC를 이용하여 분석하였다. 정상 대조군을 대상으로 각 유전 표식자의 allele 빈도 및 heterozygosity를 구하고 이를 바탕으로 PIC를 구하였다. PIC는 Botstein등이 기술했던 다음의 공식에 의하여 구하였다[14].

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2 P_i^2 P_j^2$$

Pi: allele frequency of i allele

Pj: allele frequency of j allele

### 5. FH 가계도 분석

FH 환자의 가계에 대하여 각 유전 표식자의 haplotype 분석을 시행해 유전 표식자의 유용성을 평가하고, 각 유전 표식자 사이의 재조합(recombination)을 분석하였다.

## 결 과

### 1. 정상 대조군의 임상적 특성

정상 대조군 94명의 임상적 특성은 다음과 같다. 남녀비 68 : 26, 나이 42.3±9.5세, total cholesterol 192.9±33.7 mg/dl, triglyceride 145.4±83.2 mg/dl, HDL-cholesterol 42.8±11.0 mg/dl이었다.

### 2. 유전 표식자의 대립인자 빈도

정상 대조군 94명을 대상으로 각 유전 표식자의 allele 빈도를 구하였다. RFLP 표식자인 경우 *Taq* I은 제한효소에 의한 절단되지 않은 allele의 빈도가 0.67, *Hinc* II는 제한 효소에 의해 절단된 allele의 빈도가 0.85이었으며, *Ava* II는 제한 효소에 의해 절단되지 않은 allele의 빈도가 0.84이었다(Table 4). Microsatellite marker인 경우는 분자량이 작은 것부터 많은 순으로 임의번호로 분류하였다. D19S394는 6가지, ATn은 4가지, D19S221은 8가지의 유형의 allele을 관찰할 수 있었으며 각 allele의 빈도 및 tandem repeat number는 Table 5에 보는 바와 같다.

### 3. 유전 표식자의 Heterozygosity 및 PIC 값

정상 대조군 94명을 바탕으로 실제 관찰된 heterozy-

**Table 4. Allele frequency of RFLP markers**

| | n | Genotype | | | Allele frequency | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1/1 | 1/2 | 2/2 | 1* | 2** |
| *Taq* I | 93 | 7 | 46 | 38 | 0.33 | 0.67 |
| *Hinc* II | 94 | 68 | 23 | 2 | 0.85 | 0.15 |
| *Ava* II | 91 | 2 | 26 | 66 | 0.16 | 0.84 |

1* digested by each restriction enzyme
2** not digested by each restriction enzyme

**Table 5. Allele frequency and tandem repeat number of microsatellite markers**

| n* | D19S394 | | ATn | | D19S221 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Frequency | Tandem repeat number | Frequency | Tandem repeat number | Frequency | Tandem repeat number |
| 1 | 0.09 | 9 | 0.49 | 6 | 0.04 | 20 |
| 2 | 0.34 | 10 | 0.05 | 7 | 0.05 | 21 |
| 3 | 0.50 | 11 | 0.45 | 8 | 0.09 | 22 |
| 4 | 0.05 | 12 | 0.01 | 9 | 0.14 | 23 |
| 5 | 0.01 | 13 | | | 0.41 | 24 |
| 6 | 0.01 | 14 | | | 0.09 | 26 |
| 7 | | | | | 0.14 | 28 |
| 8 | | | | | 0.04 | 29 |

n* The arbitrarily defined allele number

**Table 6. Heterozygosity and PIC value of genetic markers**

| Marker | Heterozygosity* | PIC |
|---|---|---|
| D19S394 | 0.64 / 0.59 | 0.558 |
| *Taq* I | 0.51 / 0.44 | 0.344 |
| *Hinc* II | 0.25 / 0.26 | 0.223 |
| *Ava* II | 0.28 / 0.27 | 0.233 |
| ATn | 0.56 / 0.55 | 0.455 |
| D19S221 | 0.60 / 0.77 | 0.475 |

* Observed / expected

gosity 및 allele 빈도를 이용하여 구한 heterozygosity, 그리고, PIC 값은 Table 6과 같다.

4. 유전 표식자의 조합에 따른 heterozygosity 및 PIC 값

각 유전 표식자의 유전형을 근거로 2가지 이상의 loci에서 조합 가능한 haplotype의 빈도를 얻었으며 이로부터 cumulative heterozygosity와 cumulative PIC 값을 구하였다. *Hinc* II와 *Ava* II를 조합한 결과 heterozygosity는 0.336, PIC는 0.331이었다. 두 marker는 연쇄불균형(linkage disequilibrium)을 나타내었으며, |D| 값은 0.72 ($p<0.05$)였다[15]. *Taq* I과 *Hinc* II를 조합한 결과 heterozygosity와 PIC 값은 각각 0.583과 0.520이었으며 *Taq* I, *Hinc* II, ATn 3가지를 조합했을 때의 heterozygosity 및 PIC는 각각 0.719 및 0.814이었다. D19S394와 ATn을 조합하였을 때 heterozygosity 및 PIC 값은 각각 0.813, 0.813이었다(Table 7).

**Table 7. Cumulative heterozygosity and cumulative PIC value of genetic markers**

| Marker | Heterozygosity | PIC |
|---|---|---|
| *Hinc* II+*Ava* II | 0.336 | 0.331 |
| *Taq* I+*Hinc* II | 0.583 | 0.520 |
| *Taq* I+*Hinc* II+ATn | 0.719 | 0.814 |
| D19S394+ATn | 0.813 | 0.813 |

5. FH 가계의 haplotype 분석

DNA haplotype은 각 가계에서 가급적 유전자 recombination이 발생하지 않는다는 가정하에 작성하였다.

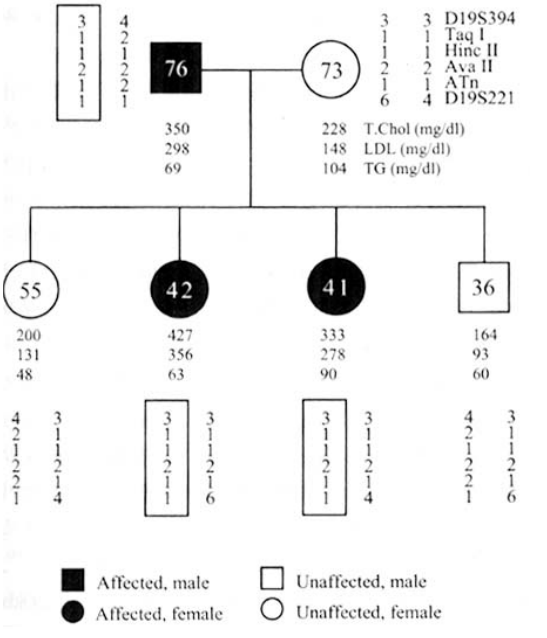



**Figure 3.** Haplotype analysis of family 1. Haplotype of the affected gene can be identified as 3-1-1-2-1-1. "1" indicates presence and "2" indicates absence of the respective restriction site in RFLP's. In microsatellite markers the number is arbitrarily defined. The number inside the symbol indicates age.

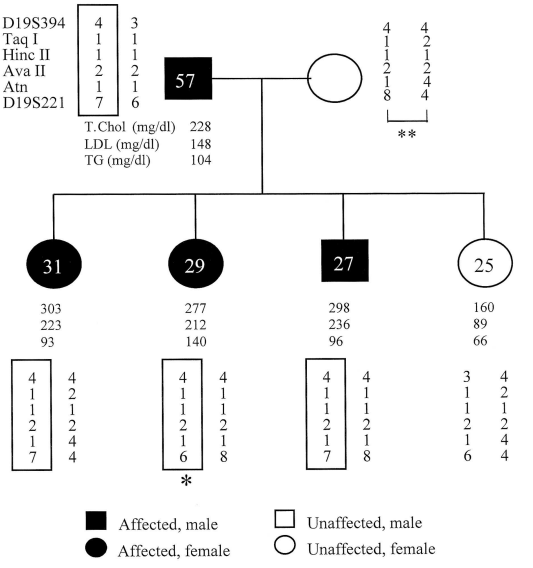



**Figure 4.** Haplotype analysis of family 2. Haplotype of the affected gene can be identified as 4-1-1-2-1-7. "1" indicates presence and "2" indicates absence of the respective restriction site in RFLP's. In microsatellite markers the number is arbitrarily defined. The number inside the symbol indicates age. * Recombination is suspected. ** Haplotypes are supposed by her offspring's haplotypes.

가계 1(Figure 3)은 아버지의 haplotype중 3-1-1-2-1-1을 통하여 LDLR 유전자 변이가 자녀들에게 전달된 것으로 확인되었다. 또한 FH proband인 아버지의 유전표식자 중 RFLP에 해당하는 *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II의 allele조합 1-1-2만으로도 FH에 이환된 자녀를 진단 할 수 있었다. Microsatellite marker중에는 D19S394와 ATn이 각각 진단에 유용하였다.

가계 2(Figure 4)는 부모 중 어머니의 haplotype을 알지 못 하는 상태에서 분석을 하였는데, 어머니의 allele haplotype을 자녀의 allele haplotype을 이용하여 추정할 수 있었다. FH proband인 아버지의 haplotype중 4-1-1-2-1-7을 공유하는 자녀가 FH에 이환된 것을 확인 할 수 있었으나 FH proband인 아버지의 *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II의 allele조합이 1-1-2로서 RFLP 만으로는 FH에 이환된 자녀를 진단할 수 없었다. 자녀 중 부모의 haplotype과 일치하지 않는 4-1-1-2-1-6 haplotype을 갖는 경우가 있어서 D19S221에서 recombination이 발생한 것으로 추정하였다. Microsatellite marker중에는 D19S394와 D19S221이 각각 진단에 도움을 주었다.

가계 3(Figure 5)은 부모 양측의 유전형을 검사하지 못하였다. 부모 중 아버지가 심근 경색에 의하여 사망하였는데 아버지가 FH proband라고 가정할 경우 아버지의 haplotype은 각각 3-1-1-2-1-5 및 3-2-2-1-1-4로 추정 할 수 있었다. 4명의 자녀중 3-1-1-2-1-5의 haplotype을 갖는 경우 FH에 공통적으로 이환되어있음을 확인 할 수 있었으며, RFLP 조합은 1-1-2로서 진단에 유용하게 이용할 수 있었다. Microsatellite marker중 단독으로 FH의 유전자 진단에 유용한 표식자는 없었다.

## 고 안

서구에서는 55세 이하에서 관상동맥질환과 연관되어 발생하는 사망의 약 5%가 FH에 기인한다고 보고된 바 있는데[16], FH의 주요 질병률(morbidity) 및 사망률(mortality)이 동맥경화증에 의하여 발생하고 그것도 비교적 이른 시기에 동맥경화증이 진행한다는 것을 감안하면 FH의 조기 선별 진단 및 엄격한 치료가 중요함을

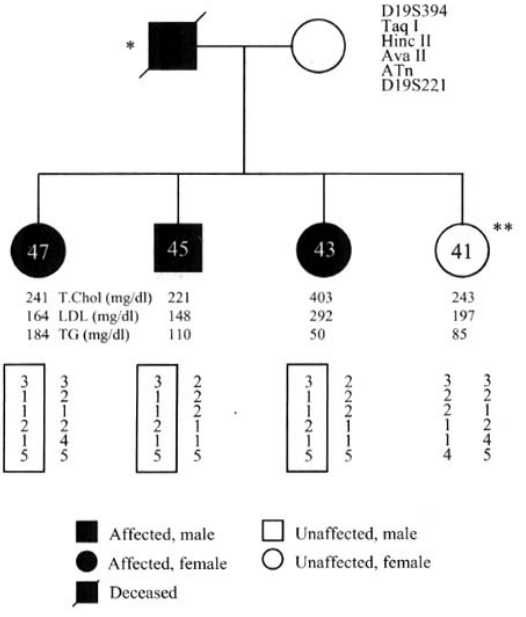



**Figure 5.** Haplotype analysis of family 3. Haplotype of the affected gene can be identified as 3-1-1-2-1-5. "1" indicates presence and "2" indicates absence of the respective restriction site in RFLP's. In microsatellite markers the number is arbitrarily defined. The number inside the symbols indicates age. * He died from acute myocardial infarction and supposed to be a FH proband. ** She is a type II diabettic patient.

알 수 있다.

FH는 LDLR 유전자의 돌연변이로 발생하며 현재까지 발견된 LDLR 유전자 변이의 종류는 300여종이 넘는 것으로 알려져 있어, 의심되는 환자 및 가계를 대상으로 알려진 LDLR 유전자 변이를 모두 검사하는 방법은 임상에서 실제로 이용하기에 어려움이 있다. 따라서 임상양상에 의존하여 FH를 진단하게 되는데, tendon xanthoma등의 특징이 나타나지 않거나, 지질 대사에 영향을 주는 다른 대사 장애에 같이 이환 되어 있는 경우 등에는 임상적인 FH의 진단이 어렵게 된다. 특히 Torres등이 보고한 것처럼 heterozygote 형태로 LDLR 유전자 돌연변이를 갖는 소아의 경우는 정상 LDL-cholesterol 혈중 농도를 보일 수 있기 때문에[17], FH의 조기 선별 진단이라는 측면에서는 FH의 임상 양상에 의존한 진단은 한계를 갖는다.

따라서 FH proband 부모의 변이 LDLR 유전자 공유 여부를 밝혀 FH를 진단하는 간접적 유전자 진단 방법이 중요한 의미를 갖게 되는데, 몇 가지 RFLP를 이용한 유전 표식자에 대한 유용성은 이미 보고된 바 있다.

Weiss등은 *Taq* I, *Hinc* II, *Nco* I등의 RFLP에 대한 PIC값을 보고한 바 있는데 각각 0.236, 0.367, 0.362로 본 연구에서 보인 0.223-0.344와 비슷한 수준으로 RFLP단독으로는 FH 환자들 간에 변이 LDLR 유전자 공유 여부를 가리기 어려웠다고 주장하였다[12]. 본 연구에서도 실제 FH 가계에서 RFLP 표식자를 haplotype 분석에 적용하였을 때, 가계 1 및 가계 3에서 RFLP 3가지 표식자를 모두 조합하였을 때 FH 환자 사이에 변이 LDLR유전자 공유 여부를 가릴 수 있었을 뿐, 각 RFLP 단독으로는 FH진단에 유용한 경우는 없었다. RFLP의 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법은 여러 가지 RFLP를 조합하는 방법 외에 microsatellite marker를 이용하는 방법이 있는데 LDLR 유전자와 연관된 microsatellite marker로는 D19S394, ATn, D19S221등이 알려져 있다[12, 13, 18]. D19S394는 LDLR 유전자에서 telomere쪽으로 약 250kb 정도 거리에 존재하며 Joanne등에 의하면 그리스 FH 환자 중 가장 많은 빈도를 보이는 G528D, V408M, S265R, C152R등의 LDLR 유전자 변이와 91-100% linkage를 보이는 것으로 알려져 있다[13]. ATn은 LDLR의 exon 18의 3' 말단에 위치하며 현재까지 알려진 유일한 LDLR 유전자 내 tandem repeat으로 유전 표식자가 갖추어야할 조건 중 해당 유전자 내에 존재하거나 또는 해당 유전자에 근접하여 recombination이 없어야 한다는 조건에 부합하는 microsatellite marker이다[12]. D19S221은 LDLR 유전자로부터 1.3 Mb정도 centromere쪽에 위치하며, 보고에 따라 차이가 있으나 LDLR와 57-71%정도 linkage disequilibrium 되어 있는 것으로 알려져 있다[13, 18]. 본 연구에서 각 microsatellite marker에 대한 PIC값을 구한 결과 D19S394, ATn, D19S221의 경우 각각 0.558, 0.455, 0.475로서 RFLP 표식자에 비하여 높은 값을 보였으나 기존에 보고된 0.9, 0.530, 0.8에 비하여 낮은 값을 보였다[12, 13, 18]. Tandem repeat의 polymorphism이 보통 DNA의 복제 과정 중 replication slippage에 기인하며 인종 및 민족에 따라 그 분포가 서로 상이함을 고려할때, 상기의 결과들은 한국인의 특성으로 이해될 수 있을 것이다[19].

실제 FH 가계에 각 microsatellite marker를 적용하였을 때 본 연구에서 하나의 표식자가 모든 가계에서 변이 유전자 공유를 설명할 수 있는 경우는 없었으나, 가

계 1의 경우는 D19S394와 ATn이 가계 2의 경우는 D19S394와 D19S221이 각각 하나의 표식자로 진단에 유용함을 보여주었다. 이는 각 microsatellite marker들의 PIC 값이 0.5내외인 점과 잘 부합한다고 볼 수 있는데, microsatellite marker의 경우도 임상에서 진단에 실제로 적용하기 위해서는 2가지 이상의 표식자가 조합되어야 함을 시사한다. 이 중 D19S394는 관찰된 allele의 종류가 6가지로 D19S221의 8가지에 비하여 가지 수가 적으나. PIC값이 0.558로 3가지 microsatellite marker중 가장 높은 값을 보였으며 LDLR 유전자 외부에 존재하는 표식자 임에도 여러 가지 다양한 LDLR 유 전자 돌연변이와 90%이상 linkage disequilibrium되어 있었던 것을 감안하면 FH의 간접적 유전자 진단을 위해 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 반면 D19S221은 PIC 0.475로서 비교적 높은 값을 보였으나 실제 FH 가계의 haplotype 분석에서는 1예의 recombination을 보임으로서 다른 유전 표식자의 병용이 뒷받침되어야 함을 알 수 있었다. 실제로 D19S221은 LDLR 유전자로부터 약 1.3 Mb정도 떨어져 있어 다른 유전 표식자에 비하여 recombination이 발생할 가능성이 높기 때문에 FH 진단에는 제한적으로 사용해야 할 것이다. ATn은 다른 microsatellite marker에 비하여 allele의 종류가 4가지로 적어 PIC 0.455를 보였지만 현재까지 알려진 유일한 LDLR 유전자 내 tandem repeat sequence라는 장점을 갖고 있다[20].

여러 가지 유전 표식자 조합 중 D19S394와 ATn의 조합은 PIC 0.813으로 유전자 내 표식자인 *Taq* I, *Hinc* II, ATn조합의 PIC 0.814와 대등한 값을 보여 두 가지 조합 모두 실제 임상에 적용할 만큼 높은 판별력을 갖추었다고 판단된다. 이중 전자의 조합은 첫째, 2가지 표식자 조합으로 후자에 비해 용이하게 검사할 수 있으며 둘째, D19S394가 90%이상 LDLR 유전자 돌연 변이와 linkage disequilibrium을 보여 다른 유전자 내 표식자처럼 낮은 recombination빈도를 보이며 셋째, D19S394와 ATn은 각각 LDLR 유전자의 5'과 3'말단에 위치해 LDLR 유전자 내에서 재조합이 발생하더라도 그 결과를 용이하게 판별 할 수 있다는 장점이 있어 *Taq* I, *Hinc* II, ATn조합에 비해 우수하다. 다만 본 연구에서는 FH 가계 분석이 3 가계에서만 이루어져 상기 두 가지 유전 표식자 조합에 대한 유용성 비교가 어려웠으며 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

## 요 약

**목적** : 가족성 고콜레스테롤혈증(Familial hypercholesterolemia, FH)은 대부분 low density lipoprotein receptor(LDLR) 유전자의 돌연변이에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있으나 유전자 변이부위의 다양성으로 인해 직접적 유전자 진단은 현실적으로 어려운 실정이다. 본 연구에서는 유전 표식자를 이용한 간접적인 유전자 진단의 유용성 및 효과적인 유전 표식자의 조합을 알아보고자 하였다.

**방법** : 혈연관계가 없는 정상인 94명을 대상으로 LDLR내 및 인접하여 존재하는 3가지 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 표식자 *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II, 및 microsatellite marker D19S394, ATn, D19S221의 allele의 빈도, heterozygosity, polymorphism information content(PIC)를 조사하여 상기 유전 표식자의 유용성을 평가하였으며, FH로 진단된 세 가계 15명을 대상으로 상기 유전 표식자를 통한 haplotype 분석을 시행하여 유전 표식자의 유용성을 검증하였다.

**결과** : 정상인 94명을 대상으로 각 유전 표식자의 heterozygosity 및 PIC를 구한 결과 D19S394, *Taq* I, *Hinc* II, *Ava* II, ATn, D19S221은 각각 0.64/0.558, 0.51/0.344, 0.25/0.223, 0.28/0.233, 0.56/0.455, 0.60/0.475 이었다. *Hinc* II와 *Ava* II는 $|D|=0.72$($p<0.05$)로 연쇄 불균형 되어 있었다. 각 유전 표식자를 조합했을 때의 PIC 값은 *Taq* I+*Hinc* II가 0.520, *Taq* I+*Hinc* II+ATn이 0.814, D19S394+ATn이 0.813이었다. FH가계도를 이용한 haplotype 분석 결과 각 유전 표식자는 단독으로 유전자 진단에 이용되기는 어려웠다. RFLP를 조합한 경우는 3가지 표식자를 모두 조합했을 때 진단에 유용한 경우가 있었으며, microsatellite marker의 경우는 D19S394와 ATn을 조합한 경우가 가장 높은 정보성을 보였다. D19S221은 1예의 유전자 recombination이 관찰되어 진단에 이용시 주의를 요한다.

**결론** : LDLR 유전자내 및 인접 유전 표식자를 이용한 FH의 간접적 유전자 진단은 직접적인 변이 검색 대신 LDLR 변이유전자의 공유 여부를 가림으로써, 가족 구성원 중 FH에 이환된 환자를 조기에 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다. 그리고, D19S394와 ATn 유전표식자의 조합이 여러 유전 표식자의 조합 중 간접적 유전자 진단에 가장 효율적이었다.

## REFERENCES


1) Goldstein JL, Brown MS. *The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Med Clin North Am 66:335, 1982*
2) Horsthemke B, Dunning A, Humpries S. *Identification of deletion in the human low density lipoprotein receptor gene. J Med Genet 24:144, 1987*
3) Leitersdorf E, Hobbs HH. Human LDL receptor gene: *Hinc II polymorphism detected by gene amplification. Nucleic Acids Res 16:7215, 1988*
4) Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein LL, Russel DW. *The human LDL receptor: a cystein rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. Cell 39:27, 1984*
5) Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. *Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 1:445, 1992*
6) Day INM, Wilson DJ, Whittal RA, Heath KE, Haddad L, Humpries SE. *A mutation databasing model using full sequence display at the core element of presentation: the LDLR gene in familial hypercholesterolemia. Presented at Mutation Database Meetings American Society of Human Genetics, October 29, 1996*
7) **김효수, 채재진, 김성한, 최성준, 채인호, 손대원, 오병희, 이명묵, 박영배, 최윤식, 이영우. 가족성 고콜레스테롤혈증 환자에서의 저비중지단백-수용체 유전자의 '소규모 돌연변이' 분석. 대한순환기학회초록집** *41:274, 1997*
8) Leitersdorf E, Chakravarti A, Hobbs HH. *polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus. Am J Hum Genet 44:409, 1989*
9) Daga A, Mattioni T, Balestreri R, Coviello DA, Corte G, Bertolini S. *Use of three DNA polymorphism of the LDL receptor gene in the diagnosis of familial hypercholesterolemia. Hum Genet 84:412, 1990*
10) Weber JL, May PE. *Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44:388, 1989*
11) Gyapay G, Morisette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millaseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. *Genethon human genetic linkage map. Nat Genet 7:246, 1994*
12) Weiss N, Gudnasson, Ostwald P, Humphries S, Schuster H, Keller C. *The usefulness of three biallelic restriction fragment length polymorphism versus a polymorphic dinucleotide tandem repeat polymorphism at the low density lipoprotein receptor gene locus for diagnosis of familial hypercholesterolemia. Dis Markers 13:141, 1997*
13) Joanne TS, Nicholas M, Emmanuel K, Eurydiki D, Steve E, Ian NM. *Analysis of low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek FH heterozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands. Hum Genet 102:343, 1998*
14) Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis R. *Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am J Hum Genet 32:314, 1980*
15) Philip WH. *Gametic disequilibrium measures: Proceed with caution. Genet 117:331, 1987*
16) Herbert S, Friedrich CL. *Clinical criteria versus DNA diagnosis in hetrozygous familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:331, 1998*
17) Torres AL, Moorjani S, Vohl MC, Gagne C, Lamarche B, Brun LD, Lupien PJ, Despres JP. *Heterozygous familial hypercholesterolemia in children: low density lipoprotein receptor mutation analysis and variation in the expression of plasma lipoprotein-lipid concentrations. Atherosclerosis 126:163, 1996*
18) De Oliviera Silva ER, Haddad L, Kwiterovich PO Jr, Humphries SE, Day INM. *Applicability of LDLR flanking microsatellite polymorphism for prenatal diagnosis of homozygous state for familial hypercholsterolemia. Clin Genet 53:375, 1998*
19) Schlotterer C, Trautz D. *Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res 20:211, 1992*
20) Zuliani G, Hobbs HH. *Dinucleotide repeat polymorphism at the 3' end of the LDLR gene. Nucleic Acids Res 18:4300, 1990*